

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-508807

(P2001-508807A)

(43) 公表日 平成13年7月3日 (2001.7.3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 35/14		A 6 1 K 35/14	C
35/12		35/12	
35/48		35/48	
38/17		A 6 1 P 17/02	
38/22		A 6 1 K 37/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-524994  
(86) (22) 出願日 平成10年11月12日 (1998. 11. 12)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年7月12日 (1999. 7. 12)  
(86) 国際出願番号 P C T / A T 9 8 / 0 0 2 7 8  
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 2 4 0 4 4  
(87) 国際公開日 平成11年5月20日 (1999. 5. 20)  
(31) 優先権主張番号 A 1 9 1 6 / 9 7  
(32) 優先日 平成9年11月12日 (1997. 11. 12)  
(33) 優先権主張国 オーストリア (A T)

(71) 出願人 バイオプロダクツ・アンド・バイオエンジニアリング・アクチエンゲゼルシャフト  
オーストリア・アー—1010ウィーン・シヨッテンリング10  
(72) 発明者 ブラウン, フリードリヒ  
オーストリア・アー—1130ウィーン・グロリエツテガツセ2  
(72) 発明者 シュベングラー, ハンス・ペーター  
オーストリア・アー—1180ウィーン・ペーリンガーシュトラッセ93  
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 傷の治癒の促進のための医薬製品

(57) 【要約】

本発明は傷の治癒の促進のための局所使用のための医薬製品に関し、これは血小板もしくは血小板断片を含んで成り、血小板もしくは血小板断片は、成長因子を含有しかつそれを放出することが可能であり、また、凍結乾燥もしくは深冷凍結された状態で存在し、そしてウイルス分割および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられている。

## 【特許請求の範囲】

1. 血小板もしくは血小板断片を含んで成る、傷の治癒の促進のための局所使用のための医薬製品であって、前記血小板もしくは血小板断片が、
  - ー成長因子を含有しかつそれを放出することが可能であり、
  - ー凍結乾燥もしくは深冷凍結された状態で存在し、そして
  - ーウイルス分割および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられている、医薬製品。
2. 血小板もしくは血小板断片の含量が、それが凍結乾燥物の再構成もしくは融解の後に1mlあたり最低 $10^4$ 、好ましくは最低 $10^5$ 個の血小板に対応するようなものであることを特徴とする、請求の範囲1に記載の医薬製品。
3. 医薬製品が付加的成長因子を含んで成ることを特徴とする、請求の範囲1もしくは2に記載の医薬製品。
4. 医薬製品が医用生体材料を含んで成ることを特徴とする、請求の範囲1ないし3のいずれか一に記載の医薬製品。
5. 医用生体材料がウイルス分割および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられていることを特徴とする、請求の範囲4に記載の医薬製品。
6. 医用生体材料が凍結乾燥もしくは急速凍結された状態で存在することを特徴とする、請求の範囲4もしくは5に記載の医薬製品。
7. 組織接着剤および／もしくはコラーゲンが医用生体材料として提供されることを特徴とする、請求の範囲4ないし6のいずれか一に記載の医薬製品。
8. 組織接着剤がフィブリノーゲンを含有するタンパク質およびトロンビンから構成されることを特徴とする、請求の範囲7に記載の医薬製品。
9. 医用製品が、付加的に、上皮細胞ならびに／またはケラチノサイトならびに／または胚および／もしくは胎児細胞ならびに／またはリポソームを含んで成ることを特徴とする、請求の範囲4ないし8のいずれか一に記載の医薬製品。
10. 傷の治癒の促進のための局所使用のための医薬製品の製造のための、成長因子を含有しかつそれを放出することが可能な血小板もしくは血小板断片の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 傷の治癒の促進のための医薬製品

本発明は傷の治癒の促進のための局所使用のための医薬製品に関する。

傷の治癒はいくつかの連続的段階で進行することが既知である。

段階Iにおいては、血漿タンパク質フィブリノーゲンが、線維素凝塊の形成を誘導するようにトロンビンにより沈殿される。線維素凝塊は血液凝固XIII因子の存在下で固化する。わずかな数分のみかかる第一段階において、出血が制御されそして傷の領域が封鎖される。

段階IIにおいては、傷の領域からの細胞、すなわち炎症細胞、結合組織細胞および内皮細胞が線維素凝塊中に移動する。それらは血管、および細胞外マトリックスとしてコラーゲンから主として構成される結合組織を形成する。肉芽組織と称されるこの結合組織は上皮組織の形成のための基層としてはたらきかつ体表面の表皮の基層となる。段階IIは数日ないし数週間継続し、そして傷の領域が上皮細胞および皮膚上の表皮により閉鎖されるや否や完了する。

傷の治癒は段階IIIにより完了され、これは数週ないし数ヶ月間継続する。その相の間に、細胞性要素が減少され、そして、結合組織が、固くかつ永続的な瘢痕組織を形成するように成長している（ベネット(Bennett N.T.)、シュルツ(Schultz G.S.)、Am. J. Surg. 1993、165:728-737；ベネット(Bennett N.T.)、シュルツ(Schultz G.S.)、Am. J. Surg. 1993、166:74-81）。

傷の治癒過程の段階IIにおける肉芽組織の形成は、結合組織細胞の移動および分割ならびに血管の再生を促進しそしてそれにより傷の治癒を加速する成長因子により達成される。既知の成長因子のうち、血小板由

来成長因子(PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )、上皮成長因子(EGF)およびインスリン様成長因子I(IGF-I)がとりわけそれらの過程に関与する（ベネット(Bennett N.T.)、シュルツ(Schultz G.S.)、Am. J. Surg. 1993、165:728-737；ベネット(Bennett N.T.)、シュルツ(Schultz G.S.)、Am. J. Surg. 1993、166:74-81；ボーラ(Bhora F.Y.)ら、J. Surg. Res. 1995、59:236-244；リンチ(Lynch S.E.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 198

7、84:640-646；リンチ(Lynch S.E.)ら、J. Clin. Invest. 1989、84:7696-7700)。

また、表皮の再生も成長因子により誘導される。それらは、傷害による無傷の基底細胞層の細胞の連合(association)から分離されている表皮細胞(ケラチノサイト)を、肉芽組織の基層、とりわけ、ケラチノサイトの移動のための暫定的足場構造を構成するフィブリン-フィブロネクチンへの接着を可能にする特異的膜レセプターを形成するように活性化する(ブラウン(Brown G.L.)ら、J. Exp. Med. 1986、163:1319-1324；ブラウン(Brown G.L.)ら、N. Engl. J. Med. 1989、321:76-79)。

成長因子は多様な組織および細胞型によりヒト体内で合成されそして周囲の体液中に分泌される。傷の治癒の状況において、重要な調節の役割は血小板に帰される。血小板は、成長因子PDGF、TGF- $\beta$ 、EGFおよびIGF-Iを有意の量で合成しかつ貯蔵することが可能であり、これらは細胞質顆粒中で傷の治癒に不可欠である(リンチ(Lynch S.E.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987、84:640-646；ギンスバーク(Ginsberg M.H.)ら、Thromb. Haemostas. 1988、59:1-6；ハイナー(Hynes O.R.)、Thromb. Haemostas. 1991、66:40-43)。

貯蔵された成長因子を血小板から放出もしくは送達させるためには、

後者は、例えばコラーゲン、トロンビン、トリプシン、ADP、セロトニンもしくはアドレナリンのような、血小板の原形質膜の外側表面上の特異的レセプターに結合する生理学的刺激剤(stimulus)により活性化されなければならない。活性化は形状の変化、次いで血小板凝集をもたらし、それに際して後者は貯蔵された成長因子を周囲の体液中に分泌する。これらの生理学的刺激剤の大部分では、活性化後の血小板凝集は成長因子の放出に前もって必要なものである。トロンビンでの刺激により、成長因子は血小板凝集を伴わずにもまた放出されうる(カプラン(Kaplan K.L.)ら、Blood 1979、53:604-618；ホルムセン(Holmsen H.)ら、J. Biol. Chem. 1981、256:9393-9396；フィリップス(Philipps D.R.)、ボーン(Baughan A.K.)、J. Biol. Chem. 1983、258:10240-10245)。

凝集に導く活性化された血小板と表面へのそれらの接着との間の相互作用は、

例えばフィブリノーゲン、フィブロネクチンおよびフォンビルブラント因子のような、活性化された血小板の原形質膜の外側上の糖タンパク質レセプターに結合する細胞外接着性マトリックスタンパク質により仲介される。これらのマトリックスタンパク質のレセプターへの強い結合は、血小板が上述されたような適切な刺激剤により活性化されている場合にのみ達成される。血小板の活性化および凝集、次いで成長因子放出というこれらの複雑な手順が、傷の治癒過程の不可欠な制御要素の一を構成する (ギンスバーク (Ginsberg M.H.) ら、Thromb. Haemostas. 1988, 59:1-6; ハイナー (Hyner O.R.)、Thromb. Haemostas. 1991, 66:40-43; ランドルフィ (Landolfi R.) ら、Blood 1991, 78:377-381; ペルシュケ (Perschke E.I.) ら、Blood 1980, 55:841-847; ハイネス (Hynes O.R.)、Cell 1992, 69:11-25; ペルシュケ (Perschke E.I.)、J. Lab.

Clin. Med. 1994, 124:439-446; サヴェージ (Savage B.)、ルゲリ (Ruggeri Z.M.)、J. Biol. Chem. 1991, 266:11227-11233; ベネット (Bennett J.S.) ら、J. Biol. Chem. 1982, 257:8049-8054; チエルニエウスキ (Cierniewski C.S.) ら、Biochim. Biophys. Acta 1982, 714:543-548; フィリップス (Philipps D.R.)、ボーン (Baughan A.K.)、J. Biol. Chem. 1983, 258:10240-10245)。

これらが例えば糖尿病患者で静脈もしくは動脈の閉塞を発生する際の傷の治癒の妨害、しかしまた例えば放射活性物質での照射もしくは火傷の後のような他の起源の傷の治癒の妨害も、とりわけ傷の治癒過程の段階IIに影響を及ぼす。こうした場合には、成長因子は、肉芽組織が形成されないかもしくは低品質の肉芽組織のみが形成されるように低下された程度存在することが見出されている (ドゥボンチ (Dvonch V.M.) ら、Surgery 1992, 112:18-23; マツオカ (Matsuoka J.)、グローテンドルスト (Grotendorst G.R.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:4416-4420)。

傷の治癒の妨害の場合に傷の治癒を高めるために、成長因子が個々にまたは純粋な物質としてもしくは軟膏基剤中に混合された組み合わせ剤でのいずれかで傷の領域に適用されることが既知である (ナイトン (Knighton D.R.) ら、Surg. Gynecol. Obstet. 1990, 170:56-60; ブラウン (Brown G.L.) ら、J. Exp. Med. 1986

、163:1319-1324；ホルムセン(Holmsen H.)ら、J. Biol. Chem. 1981、256:9393-9396)。この様式で提供される成長因子は、しかしながら、迅速に不活性化もしくは分解され、そして、適用後短い時間の期間（数分）にわたってのみそれらの活性を発生する。かように、これらの製剤は傷の治癒の満足できる増強を提供し

ない。

他の既知の治療的アプローチは、傷の領域の永続的な湿気を確保することを目標とされたコラーゲンスポンジもしくは他の製剤で傷の領域を覆うこと、または、新たな結合組織が傷床から再成長する(re-grow)ことを可能にするように醗酵により傷の領域の表在性結合組織層を分解する製剤を使用することに存する（ニールセン(Nielsen P.G.)ら、Acta Dermato-Venerologica 1990、Suppl. 152:1-12；リップパート(Lippert P.)、ヴォルフ(Wolff H.)、Zent. bl. Chir. 1990、115:1175-1180)。

にもかかわらず、これまで適用された傷の包帯および製剤もしくは医薬製品のいずれも傷の治癒の向上において満足できる結果をもたらしていない。

本発明の目的は、慣習的療法に比較して、自然の傷の治癒過程を効果的に加速し、そして、傷の治癒が妨害される場合、とりわけ重症の形態の傷の治癒の妨害において傷の治癒を本質的に向上させることが可能である医薬製品を提供することである。

本発明に従えば、本目的は、傷の治癒の促進のための局所使用のための医薬製品が提供されることにおいて達成され、この製品は血小板もしくは血小板断片を含んで成り、前記血小板もしくは血小板断片は、成長因子を含有しかつそれを放出することが可能であり、凍結乾燥もしくは急速凍結された(deep-frozen)状態で存在し、そしてウイルス分割(partitioning)および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられている。

「血小板断片」は、ナノ濾過(nanofiltration)を包含する濾過もしくは超遠心を包含する遠心分離のいずれかにより可溶性の血小板構成要素から分離可能であるいかなる不溶性の血小板構成要素も示すことを意図

される。

別の方法で示されない限り、以下での「血小板」という用語は「血小板断片」もまた包含する。

本発明は、成長因子を含有しかつそれを放出することが可能な血小板の局所使用が傷の治癒過程を効果的に加速し得るという知見を基礎とする。傷の領域に適用される血小板は、傷の治癒過程の促進に必要とされる成長因子の天然の貯蔵所を構成する。傷の領域に存在する生理学的刺激剤による局所に適用された血小板の活性化、ならびに傷の領域に存在するマトリックスタンパク質のその後の凝集および結合が、血小板中に貯蔵された成長因子が延長された時間の期間（数日）にわたって継続的に傷の領域中に放出されることにつながるが見出されている。この事実のため、より高濃度の成長因子が、成長因子の直接投与でより本質的により長い時間の期間にわたって傷の領域中で明らかに利用可能であり、それにより炎症細胞、結合組織細胞および内皮細胞の移動を促進しかつ傷の治癒過程の段階IIにおける前記細胞の増殖を高める。その様式において、肉芽組織の迅速かつ十分な形成が確実にされ、これは順に上皮組織の形成および最終的な傷の封鎖を可能にする。さらに、上皮化過程が、上皮細胞の移動および増殖を促進する放出された成長因子により付加的に加速される。

当該医薬製品が延長された時間の期間にわたって保存され得ることを確実にするために、本発明の医薬製品中の血小板は、好ましくは、凍結乾燥もしくは急速凍結された状態で存在する。ウイルス感染の危険を最小限にするためには、この血小板は、有利には、ウイルス分割および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられ、それにより物理的もしくは

は化学的または組み合わせられた方法が使用されてよい。

とりわけ傷の治癒の妨害の治療においてより高濃度の成長因子を提供するためには、本発明の医薬製品の血小板もしくは血小板断片の含量が、それが凍結乾燥物の再構成もしくは融解の後に1  $\mu$ lあたり最低 $10^4$ 、好ましくは最低 $10^5$ 個の血小板に対応するようなものであることが好ましい。

適用に際して直ちに本発明の医薬製品のとりわけ顕著な初期効果を得るために

は、とりわけ傷の治癒の重症の妨害の場合に、当該医薬製品が、当該医薬製品中に含有される血小板由来でない付加的な成長因子を含むことが適切でありうる。この付加的な成長因子は貯蔵されたものと同一の型のものであってよく、また、本発明の医薬製品のもしくは異なる型に属する血小板により放出されてよい。この成長因子は血小板とともに同一容器中に存在してよい、または溶液もしくは凍結乾燥物の形態で別個の容器中に含有されてよい。

とりわけ妨害された傷の治癒の重症の場合において、当該医薬製品が医用生体材料を含んで成ることが有利であることが見出されている。本発明の意味における「医用生体材料」は、組織適合性かつ吸収されやすく、また、当該医薬製品中に含有される血小板もしくは成長因子と共同してまたはそれから独立にのいずれかで傷の治癒の促進において補助するいずれかの材料を含むことが意図される。従って、刺激剤として血小板を活性化する物質および／もしくは血小板凝集を仲介する材料が、本発明の医薬製品中の医用生体材料として含有されてよい。その様式において、血小板を活性化しかつそれらの凝集を仲介する、傷の領域に存在する天然の物質の活性が高められ、これは成長因子の放出を増大させか

つ傷の治癒をいっそうさらに促進する。

ウイルス感染の危険を最小限にするためには、医用生体材料は、好ましくはウイルス分割および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられ、物理的もしくは化学的方法または組み合わせられた方法が適用されてよい。この医用生体材料は、個々にもしくは当該医薬製品の他の成分（例えば血小板）と混合されてのいずれかでこうした方法にかけられてよい。

当該医薬製品が延長された時間の期間にわたって保存され得ることを確実にするため、本発明の医薬製品中の医用生体材料は、有利には、凍結乾燥もしくは急速凍結された状態で存在する。その場合、医用生体材料は、血小板および／もしくは成長因子と同一の容器中に存在してよいまたは別個の容器中に含有されてよく、また、医用生体材料の急速凍結もしくは凍結乾燥は、個々にもしくは当該医薬製品の他の成分との混合物中で達成されてよい。

血小板の活性化および凝集、そしてこれゆえに血小板中に貯蔵された成長因子



の放出は、マトリックスタンパク質の付着により可能にされることが既知である。さらに、こうしたタンパク質は、血小板が接着する架橋された構造を形成しそして傷の領域にしっかりと結合することができ、こうした構造は成長因子の傷の領域への拡散および傷の領域からの細胞の移動を促進する。従って、本発明の医薬製品の好ましい一態様は、組織接着剤および／もしくはコラーゲンが医用生体材料として提供されることを特徴とする。本発明の意味における組織接着剤は、組織接着に適する架橋可能なタンパク質から完全にもしくは部分的に成る医用生体材料を包含することが意図される。

フィブリノーゲンは活性化された血小板の凝集を誘発するためのとりわけ活性の物質である一方、トロンビンも血小板の活性化のための最も活性の物質の一を代表する。従って、組織接着剤がフィブリノーゲンを含有するタンパク質およびトロンビンから構成されることが、成長因子の放出の増大および傷の治癒の増強に有利である。

ケラチノサイト、上皮細胞、胚および胎児細胞のようなヒト細胞ならびにリボソームのような細胞構成要素が、血小板に促進される傷の治癒および細胞増殖を付加的に加速することが可能であることが示されている。従って、当該医薬製品は、付加的に上皮細胞ならびに／またはケラチノサイトならびに／または胚および／もしくは胎児細胞ならびに／またはリボソームを含んで成ることが好ましい。これらの細胞もしくはリボソームは、液体、もしくは深冷凍結された懸濁液として、または別個の容器中の凍結乾燥物として、あるいは、挙げられた細胞型もしくはリボソームの1種もしくは数種が、共通の容器中に当該医薬製品の他の成分のいずれかを伴わずもしくはそれとともにのいずれかで存在してよい。

ウイルス感染の危険を最小限にするためには、当該細胞もしくはリボソームはウイルス分割および／もしくはウイルス不活性化の方法にかけられていてよく、それにより物理的もしくは化学的方法または組み合わせられた方法が使用されてよい。当該細胞もしくはリボソームは、個々にもしくは当該医薬製品の他の成分と混合されてのいずれかでこうした方法にかけられてよい。

本発明はまた、傷の治癒の促進のための局所使用のための医薬製品の製造のた

めの成長因子を含有する血小板もしくは血小板断片の使用にも関する。

本発明の好ましい態様が今や例としてより詳細に説明されることができる。

#### 実施例1：本発明の医薬製品の製造

ヒト血小板濃縮物もしくは血小板構成要素の濃縮物を、原形質および他の細胞構成要素を排除するために3%クエン酸ナトリウムにより抗凝固し(anticoagulated)かつ遠心分離する(1000g/20分)。血小板豊富な上清もしくは血小板構成要素の上清をRPMI培地に懸濁し、そしてRPMI培地中で3回洗浄する(1000g/20分)。洗浄された血小板もしくは洗浄された血小板構成要素をRPMI培地に懸濁し、そして、1 $\mu$ lあたり最低 $6 \times 10^5$ 個の血小板もしくは血小板構成要素の濃度に調節する。この後、血小板懸濁液を実施例3のウイルス不活性化方法にかけ、そしてその後下述される方法に従って急速凍結もしくは凍結乾燥し、それにより本発明の医薬製品を得る。

深冷凍結：1mlの血小板懸濁液をそれぞれ30~40分以内で $-80^{\circ}\text{C}$ でショック深冷凍結し(shock deep-frozen)、そして深冷凍結された状態で保存する。使用前に血小板濃縮物を室温で融解する。

凍結乾燥：1mlの血小板懸濁液をそれぞれ最低24時間 $-80^{\circ}\text{C}$ でショック急速凍結し、そしてその後真空中 $-20^{\circ}\text{C}$ ないし $-40^{\circ}\text{C}$ で20ないし24時間凍結乾燥する。凍結乾燥された血小板を $-20^{\circ}\text{C}$ と $-80^{\circ}\text{C}$ との間で保存し、そして使用前に1mlのRPMI培地で再水和する。

#### 実施例2：医用生体材料を含む本発明の医薬製品の製造

実施例1に従って製造されたウイルス不活性化された血小板懸濁液を、架橋可能なヒトタンパク質(フィブリノーゲン、フィブロネクチン、血液凝固XIII因子もしくはコラーゲンのいずれか)の溶液で補充する。こ

れらのタンパク質は各タンパク質型を別個にもしくは組み合わせて一緒に実施例4のウイルス不活性化のための1種もしくは数種の方法にかけられていてもよく、補充された溶液中の架橋可能なタンパク質型の濃度は好ましくは70~90mg/mlに相当するべきである。架橋可能なヒトタンパク質の溶液に対する血小板懸濁液

の混合比は好ましくは1:3であるべきである。かように得られた混合物を、適する貯蔵性を得るために、実施例1で記述された方法に従って深冷凍結もしくは凍結乾燥する。

個々の成分(血小板もしくは医用生体材料)でウイルス不活性化を実施する代わりに、実施例3の方法に従って血小板懸濁液およびタンパク質溶液の混合物でウイルス不活性化を達成することもまた可能である。

#### 実施例3: 血小板懸濁液のウイルス不活性化(光学的ウイルス不活性化)

実施例1に従って製造された血小板懸濁液50mlに、全体の光強度が3.5ないし4.8mW/cm<sup>2</sup>となるように8-メトキシプソラレン(ジメチルスルホキシド[DMSO]に溶解された)を300μl/mlの最終濃度(DMSOの最終濃度0.3%)まで添加し、そして、22~27℃で5%CO<sub>2</sub>および95%N<sub>2</sub>の雰囲気下かつ2psiの圧で、下および上から6時間紫外光で照射する(リン(Lin L.)ら、Blood 1989、74:517-525)。

光不活性化が完了した後に、その様式で得られた血小板懸濁液をそれらの機能性の能力について検査する。機能性の能力を、線維芽細胞培養物における[<sup>3</sup>H]ーチミジンの取り込みを測定することにより測定する。

#### 実施例4: 医用生体材料のウイルス不活性化(化学的ウイルス不活性化)

実施例1に従って製造された血小板懸濁液に混合される医用生体材料

を、溶媒洗剤法によりウイルス不活性化する。この目的のため、医用生体材料の懸濁液を、30℃で1%(w/w)リン酸トリ(n-ブチル)および1%(w/w)トリトンX-100で補充し、そしてこの混合物を4時間振とう下に保つ。この後、5%(v/v)ダイズ油の添加下の溶媒洗剤混合物を、C18カラム(ウォーターズ ミリポア(Waters Millipore)上でのクロマトグラフィーにより、医用生体材料の懸濁液から除去する(ホロヴィッツ(Horowitz B.)ら、Blood 1992、79:826-831; ピエ(Piet M.P.J.)ら、Transfusion 1990、30:591-598; ピケ(Piquet Y.)ら、Vox sang. 1992、63:251-256)。

上述された化学的ウイルス不活性化法により処理された医用生体材料をその後、なおその上に光学的ウイルス不活性化にかけてよい。

## 実施例5：本発明の医薬製品による結合組織増殖の促進の評価

この試験は線維芽細胞培養物で実施した。実施例2に従って製造された医薬製品を、 $1\text{ cm}^2$ あたり $200\mu\text{ l}$ の量で細胞培養プレート上に適用し、そして $50\mu\text{ l}$ のトロンビン溶液（ $1\text{ ml}$ 生理学的生理的食塩水あたり $3.2\text{ IU}$ のトロンビン）により活性化した。一次培養物の第4から第10までの継代由来のヒト線維芽細胞を、適用された懸濁液上に $1\text{ cm}^2$ あたり細胞 $4 \times 10^4$ 個の密度で置き、そして細胞培養培地（RPMI）中で培養した（培養物1）。培養の第3、5および7日に、細胞の有糸分裂速度を、 $[\text{H}]$ ーチミジンの取り込みを介してDNA合成を測定することにより測定した。培養物1の細胞の有糸分裂速度を、本発明の医薬製品の添加を伴わない、10体積%の仔ウシ血清で補充されたRPMI栄養源(nutrient)中で得られた(realized)別の線維芽細胞培養物（培養物2）の細胞の有糸分裂速度と比較した。

結果：培養第3日に、培養物1は、培養物2のものより7倍大きかった $[\text{H}]$ ーチミジン取り込み( $196645 \pm 56864\text{ cpm/ml}$ )を表わした。第5 ( $152749 \pm 93951\text{ cpm/ml}$ ) および第7 ( $77045 \pm 27974\text{ cpm/ml}$ ) 日に、培養物1における $[\text{H}]$ ーチミジンの取り込みはなお培養物2のものより5ないし10倍大きかった。培養物1と培養物2との間のこれらの差異は統計学的に高度に有意であり（ $p < 0.01$ ）、延長された時間の期間（最低7日）にわたって結合組織増殖を促進しかつその活性を維持する本発明の医薬製品の能力を立証する。

実施例6：継続的に放出されるはずである血小板に貯蔵された成長因子をもたらず血小板表面へのマトリックスタンパク質の結合の評価

この試験は線維芽細胞培養物（実施例5による）で実施した。培養物1（実施例5でのような）を本発明の医薬製品で補充した。培養物2においては、血小板を、マトリックスタンパク質が血小板表面に結合することを予防するようにマトリックスタンパク質の表面上の結合部位に対する特異的抗体で処理した。培養第3日に、細胞の有糸分裂速度を、 $[\text{H}]$ ーチミジンの取り込みを介してDNA合成を測定することにより測定した。

結果：培養物1は実施例5のものに類似のチミジン取り込み速度を表わした一方

、チミジン取り込みは培養物2で測定され得なかった。その差異は、血小板表面へのマトリックスタンパク質の結合は血小板に貯蔵された成長因子が放出されるために必要であることを証明する。

#### 実施例7：本発明の医薬製品による傷の治癒の促進の評価

本発明の医薬製品の臨床的有効性を、下肢の慢性の非治癒性皮膚潰瘍に罹っておりかつ成功を伴わず6ヶ月以上の間外科的もしくは保存的局

所療法により既に治療された6例の患者で研究した。潰瘍はナイトン(Knighton D.R.)ら、Ann. Surg. 1986、204:322-330に従った傷の評点(wound score)を使用して分類した。傷の評点は、潰瘍の一般的パラメータ、解剖学的状態および測定可能な変数を包含する。評点が高くなるほど治癒の前提条件は不十分になり；達せられるはずの最高点数は97である（＝最悪の開始状況）。

#### 治療計画：

潰瘍を清浄にし、壊死組織を除去し、そしてトロンビン溶液（RPMI培地1mlあたり3.2IUのウシトロンビン）で湿した。この後、傷(defect)を実施例2に従って製造された本発明の融解された医薬製品で満たし、そして前述のトロンビン溶液をその後、血小板を活性化するために、3：1のトロンビン溶液に対する医薬製品懸濁液の体積比で適用した。その様式で治療された潰瘍を非接着性傷包帯（金属箔）により覆った。治癒まで潰瘍を上と同定された様式で週2回治療した。治癒の進行を写真でおよび組織学的に（治療第2および第5週での微細針での生検）実証した。

#### 結果：

治療開始時の人口統計、患者の原因となる血管および代謝性の疾患、ならびに傷の評点の評価を表1に要約する。

表 1

患者	性	年齢	血管疾患 動脈	静脈	代謝性 疾患	傷の評点
1	男性	67	+	+	糖尿病気	51
2	"	72	+	-	-	65
3	"	69	+	-	"	33
4	"	63	+	-	"	49
5	"	78	+	+	"	63
6	女性	74	-	+	-	65 <sup>a</sup> /63 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup>) 一方の脚に2個の潰瘍：<sup>a</sup>) 近位、<sup>b</sup>) 遠位潰瘍

傷の治癒の時間経過（治療の開始以降の週で示される）を表2に具体的に説明する。

表 2

患者	肉芽組織 形成の開始	上皮化の開始	上皮化の完了
1	第1週	第3週	第8週
2	"	"	第9週
3	第3週	第8週	第12週
4	第1週	第4週	第10週
5	"	なし	なし
6	<sup>a, b</sup> "	<sup>a</sup> 第6/ <sup>b</sup> 第3週	<sup>a</sup> 第12/ <sup>b</sup> 第9週

<sup>a, b</sup>) 一方の脚に2個の潰瘍：<sup>a</sup>) 近位、<sup>b</sup>) 遠位潰瘍

患者3を除いて、肉芽組織は、既に治療第1週以内で患者全員で潰瘍

の底部から開始して形成された血液を十分に供給され、この肉芽組織は、本発明の医薬製品でのさらなる治療に際して治療開始後およそ2週まで増大し、そして潰瘍をふさいだ。既に治療第1日後に潰瘍の周囲が落ち着き、周囲の皮膚の紅斑

および浮腫が消失し、そしてまた潰瘍の縁も患者全員でもはや浮腫状かつ変色して (miscolored) いなかったことが印象的であった。組織学的には、線維芽細胞および線維細胞から主として成りかつ集中的な新たな血管形成および膠原性線維形成、ならびに炎症細胞のわずかな浸潤および表面上の組織壊死のみを表わす細胞豊富な肉芽組織は、治療第2週に全生検で見られることになった。治療第3週後の皮膚の傷の上皮化は傷の縁から開始し、そしてその後治療第5週の第二の生検により組織学的に検出もまたし得た。さらなる治療経過中に、潰瘍の大きさは上皮化、しかしまた癒痕性収縮によっても減少した。患者5を除き、彼らは最も遅い者で治療第12週中に治癒して傷が残った。

上に示された結果は、本発明の医薬製品の局所使用が、傷の治癒を促進し、そして従って、成功なしにそして従って傷の治癒に対し極めて不十分な予後を表わす、最低6ヶ月間保存的療法により治療された患者の慢性に非治癒性の皮膚潰瘍を完全に治癒することが可能であることを立証する。

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No PCT/AT 98/00278		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K35/14 A61K38/18 //(A61K38/18,35:14)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 34614 A (THERATECHNOLOGIES INC) 25 September 1997 see page 7, line 16-19; claims 1-8 ---	1-10
Y	DATABASE WPI Section Ch. Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 73-31168U XP002092218 & SU 353 724 A (ARLOZOROV ZG) see abstract ---	1-10
Y	WO 91 17655 A (CRYOPHARM CORP) 28 November 1991 see page 4, line 33 - page 5, line 1; claims 1-4 --- -/-	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 February 1999		Date of mailing of the international search report 15/02/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 8200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 3* 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Herrera, S



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/AT 98/00278

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VALERI C R ET AL: "A SIMPLE METHOD FOR FREEZING HUMAN PLATELETS USING 6% DIMETHYLSULFOXIDE AND STORAGE AT - 80 C" BLOOD, vol. 43, no. 1, 1 January 1974, pages 131-136, XP000563674 -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No  
PCT/AT 98/00278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9734614 A	25-09-1997	US 5834418 A	10-11-1998
		AU 2019597 A	10-10-1997
WO 9117655 A	28-11-1991	US 5213814 A	25-05-1993
		AT 149284 T	15-03-1997
		AU 7888391 A	10-12-1991
		CA 2064228 A	18-11-1991
		DE 69124915 D	10-04-1997
		EP 0483329 A	06-05-1992
		JP 5500231 T	21-01-1993

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テームコード (参考)

A 6 1 P 17/02

A 6 1 K 37/24

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 アイブル, ヨハン

オーストリア・アー——1180 ウイーン・グスタフ  
フーツエルマク—ガツセ 2